

DIE FERMENTATIVE BILDUNG
VON ACETYLCHOLIN IN DER STUBENFLIEGE
(MUSCA DOMESTICA)

(Auszug)

Inauguraldissertation
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von Adolf Roth aus Nürnberg

Verlag Chemie GmbH Weinheim/Bergstr.

1958

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 1956
Dekan: Universitätsprofessor Dr. Th. Schneider
Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. O. Dann
Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. G. Hesse

Sonderdruck aus
Justus Liebigs Annalen der Chemie
Band 612 (1958)

SONDERDRUCK AUS
JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE

Acetylcholin IV

DIE CHOLINACETYLASE UND DIE PHOSPHOTRANSACETYLASE
DER STUBENFLIEGE (MUSCA DOMESTICA)

VON OTTO DANN UND ADOLF ROTH

Aus dem Institut für Angewandte Chemie der Universität Erlangen

Liebigs Ann. Chem. 612, 34–54 (1958)



VERLAG CHEMIE · GMBH · WEINHEIM/BERGSTR.

Acetylcholin IV

DIE CHOLINACETYLASE UND DIE PHOSPHOTRANSACETYLASE
DER STUBENFLIEGE (MUSCA DOMESTICA)

von OTTO DANN und ADOLF ROTH *

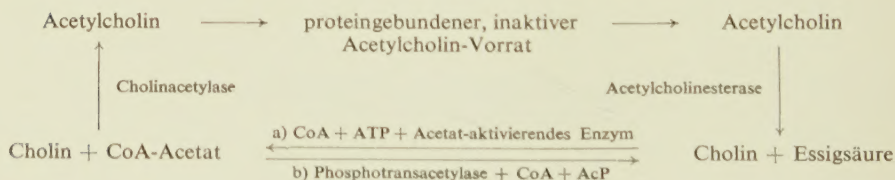
Aus dem Institut für Angewandte Chemie der Universität Erlangen

Eingegangen am 25. Oktober 1957

Aus dem Extrakt von acetongetrocknetem Fliegenpulver wird bei p_H 4.5 Acetat-aktivierendes Enzym denaturiert ausgefällt. Aus der Restlösung läßt sich bei p_H 6.8 durch Ammonsulfat die Cholinacetylase in demselben Konzentrationsbereich fällen wie die bisher bekannten Cholinacetylasen aus Nervengewebe. Bei höheren Konzentrationen fällt eine Phosphotransacetylase, welche Acetylphosphat in Abwesenheit von Coenzym A spaltet und keine Arsenolyse zeigt. — An Hand einer entwicklungsgeschichtlichen Zusammenstellung bekannter Vorkommen von Phosphotransacetylasen und Cholinacetylase werden weitere mögliche Vorkommen diskutiert.

Für den biologischen Abbau und den Aufbau von Acetylcholin läßt sich nach den Ausführungen von D. NACHMANSOHN¹⁾ folgende Übersicht entwerfen (Schema 1):

Schema 1. Aufbau und Abbau von Acetylcholin



Sowohl für die Acetyl-Cholinesterase als auch für die Cholinacetylase ist charakteristisch, daß die Gleichgewichte ganz einseitig liegen und somit praktisch keine Rückreaktionen beobachtet werden. In Extrakten aus Nervengewebe von Säugetieren wird Coenzym A-acetat (CoA-Ac) nach a) zugebracht mit Adenosintriphosphat (ATP) als Energiequelle¹⁾. Im Extrakt aus dem Milchsäurebakterium *Streptobacterium plantarum* 10 S haben wir den Fall kennengelernt, daß CoA-Ac sowohl nach a) zugebracht wird — mit ATP als Energiequelle — als auch nach b) — mit der Energie-

*) Aus der Dissertation A. ROTH, Univ. Erlangen 1956.

¹⁾ D. NACHMANSOHN, *Die Rolle des Acetylcholins in den Elementarvorgängen der Nervenleitung*, Ergebn. Physiol., biol. Chem. exp. Pharmacol. **48**, 575 (1955) mit zahlreichen Literaturangaben.

quelle Acetylphosphat (AcP) — und daß eine Acetylcholin-synthetisierende Transacetylase, eine Phosphotransacetylase mit Cholinacetylase-Aktivität, vorkommt^{2,3)}. Wir haben uns daraufhin gefragt, wie die Bildung von Acetylcholin wohl im Extrakt aus dem Nervengewebe eines Insekts erfolgt, also eines Lebewesens, welches in der Entwicklungsstufe zwischen Säugetier und Bakterium steht.

Das reichliche Vorkommen von Acetylcholin und von Acetylcholinesterasen im Nervengewebe von Insekten ist mehrfach belegt⁴⁾. Über die zellfreie Bildung von Acetylcholin im Extrakt von Insekten berichtete kurz S. E. LEWIS⁵⁾, welcher in Eserinhaltigen Extrakten aus Schmeißfliegen (*Calliphora erythrocephala*) und Goldfliegen (*Lucilia sericata*) nach mehrstündiger Inkubation einen vervielfachten Gehalt an Acetylcholin beobachtete.

Für unsere Versuche benützten wir — der guten, Jahreszeit-unabhängigen Züchtbarkeit wegen — die Stubenfliege (*Musca domestica*). Deren Gehalt an Acetylcholin^{4,6)} und Acetylcholinesterase⁷⁾ ließ auch eine beträchtliche Acetylcholinbildung erwarten.

ACETYLCHOLINBILDUNG IN FLIEGENBREI

SOWIE IM EXTRAKT AUS ACETONGETROCKNETEM FLIEGENPULVER

In einem aus 1 Teil Stubenfliegen und 5 Teilen Extraktionslösung bereiteten Fliegenbrei läßt sich nach 12stdg. Inkubation bei 28° nur bei Zusatz von ATP eine vermehrte Acetylcholinbildung nachweisen, nicht aber bei Zusatz von Acetylphosphat (AcP) oder von Glucose (Tab. 1). In der durch Zentrifugieren des Fliegenbreis er-

Tabelle 1. Acetylcholinbildung im Fliegenbrei und im Zentrifugat

Die mit 0.1 *n* KOH auf *p*_H 6.7 eingestellten 4 ccm Inkubationsansätze enthielten außer den angegebenen Zusätzen im ccm: 1 mg Cystein·HCl, 1 mg Cholinchlorid, 0.2 mg MgCl₂·6H₂O, 13.6 mg Natriumacetat·3H₂O, 0.25 mg Eserinsulfat. — Es wurde 12 Std. bei 28° inkubiert.

	Zusatz/ccm Inkubationslösung								
Fliegenbrei	0.5	0.5	0.5	0.5	—	—	—	—	ccm
Zentrifugat	—	—	—	—	0.5	0.5	0.5	0.5	ccm
ATP-Na ₂	—	1	—	—	—	1	—	—	mg
AcP-Li ₂	—	—	1	—	—	—	1	—	mg
Glucose	—	—	—	2	—	—	—	2	mg
Acetylcholin, gef.	2	6	2	2	2	13	3	3	γ/ccm

2) Acetylcholin I: Liebigs Ann. Chem. **601**, 202 (1956).

3) Acetylcholin II: Liebigs Ann. Chem. **601**, 216 (1956).

4) V. B. WIGGLESWORTH, *The Principles of Insect Physiology*, 4. Aufl., Methuen & Co., Ltd., London 1950, S. 118.

5) Nature [London] **172**, 1004 (1953).

6) F. P. W. WINTERINGHAM, Int. J. appl. Radiation and Isotopes **1**, 57 (1956); W. CHEFURKA und B. N. SMALLMAN, Nature [London] **175**, 946 (1955).

7) F. DUSPIVA, Mitt. biol. Zentralanst. Land- und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem **1951**, 91 [C. **1951** II, 2941]; H. TAUBER und E. L. PETIT, J. Amer. chem. Soc. **75**, 1257 (1953); B. N. SMALLMAN und L. S. WOLFE, Enzymologia [Den Haag] **17**, 133 (1954/56); L. E. CHADWICK, J. B. LOVELL und V. E. EGNER, Biol. Bull. **106**, 139 (1954); J. E. CASIDA, Biochem. J. **60**, 487 (1955).

haltenen Restlösung, dem *Zentrifugat*, wird bei Zusatz von ATP doppelt soviel Acetylcholin gebildet als im Brei. Bei Zusatz von AcP oder Glucose wird nur eine geringere Acetylcholinbildung beobachtet (Tab. 1).

Wenn der Fliegenbrei vor der Inkubation längere Zeit bei Raumtemperatur steht, verliert er ebenso wie das daraus bereitete *Zentrifugat* die Fähigkeit, Acetylcholin zu bilden. Wahrscheinlich werden durch Proteasen die Fermente schnell abgebaut. Diese Autolyse läßt sich, wie wir schließlich fanden, umgehen, wenn wir einen *möglichst rasch*, kalt hergestellten Fliegenbrei *sofort* in kaltes Aceton gießen und den Niederschlag mit Aceton auswaschen. Dieses haltbare, *acetongetrocknete Fliegenpulver* gleicht den Acetontrockenpulvern von Säugetierhirn^{1,8)} und Milchsäurebakterien²⁾.

In bewährter Weise wird aus dem Gemisch von acetongetrocknetem Fliegenpulver und Aluminiumpulver²⁾ ein *Extrakt* erhalten, welcher Cholinesterase enthält und welcher überraschenderweise nach Zusatz von ATP eine verminderte, nach Zusatz von AcP eine erhöhte Acetylcholinbildung aufweist (Tab. 2).

Tabelle 2. Acetylcholinbildung im Extrakt

Die mit 0.1 *N* KOH auf p_H 6.8 eingestellten 4 ccm Inkubationslösung enthielten außer den angegebenen Zusätzen im ccm: 1 mg Cystein·HCl, 1 mg Cholinchlorid, 0.2 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.5 mg Titriplex III (E. MERCK), 13.6 mg Natriumacetat·3 H_2O . — Nach 3 stdg. Inkubation bei 28° wurde durch jeweilige Zugabe von 2 Tropfen 2 *N* HCl auf $p_H \sim 4.5$ eingestellt und durch kurzes Aufkochen und rasches Abkühlen im fließenden Wasser abgebrochen.

Zusatz/ccm Inkubationslösung					
Extrakt	0,5	0,5	0,5	0,5	ccm
Eserinsalicylat	—	0,25	0,25	0,25	mg
ATP-Na ₂	—	—	1	—	mg
AcP-Li ₂	—	—	—	1	mg
Acetylcholin, gef.	83	385	253	454	γ /ccm
Acetylcholin/g Protein $\times$ Stdn.	4	17	11	21	mg

In den ersten vier Stunden der Inkubation nimmt die mit Extrakt gebildete Menge Acetylcholin sehr viel stärker gleichmäßig zu als nachher. Dialysieren läßt sich der Extrakt ohne Inaktivierung gegen Extraktionslösung, nicht aber gegen Wasser.

Damit sind in der Stubenfliege die drei Fermentarten festgestellt: *Cholinacetylase*, *Acetat-aktivierendes Enzym* und *Phosphotransacetylase*. Die Abtrennung eines Acetat-aktivierenden Enzyms aus dem Extrakt und die Scheidung einer Phosphotransacetylase von der Cholinacetylase sowie deren Anreicherung und Charakterisierung haben wir wie folgt ausgeführt.

FRAKTIONIERUNG DES EXTRAKTES UND UMFÄLLUNG DER FRAKTIONEN

Durch die elegante, von H. KUMAGAI und S. EBASHI⁹⁾ eingeführte Essigsäurefällung bei p_H 4.5 wird, ebenso wie im Extrakt aus Meerschweinchenhirn⁹⁾ oder aus acetone-

⁸⁾ W. FELDBERG und T. MANN, J. Physiology **103**, 28 P (1944/45).

⁹⁾ Nature [London] **173**, 871 (1954).

getrockneten Milchsäurebakterien³⁾, auch im Extrakt aus acetongetrocknetem Fliegenpulver die Hauptmenge an *Acetat-aktivierendem Enzym* zusammen mit viel Begleitproteinen gefällt. Die Suspension dieser Fällung, *Fraktion A*, ist inaktiv (Tab. 3) und wohl ebenso denaturiert wie die entsprechende Fällung aus dem Extrakt von Meeresschweinchenhirn⁹⁾. Die bei der Essigsäurefällung des Extraktes bleibende Restlösung, *Fraktion B*, enthält *Cholinacetylase* und *Phosphotransacetylase* (Tab. 3).

Tabelle 3. Essigsäurefällung des Extraktes bei p_H 4.5, Fraktionen A und B
Versuchsbedingungen wie in Tabelle 2. Inkubationszeit 12 Stdn.

Zusatz/ccm Inkubationslösung								
Dialysierter Extrakt	0.25	0.25	—	—	—	—	—	ccm
Dialysierte Fraktion A	—	—	0.25	0.25	—	—	0.25	ccm
Dialysierte Fraktion B	—	—	—	—	0.25	0.25	0.25	ccm
Eserinsalicylat	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	mg
CoASH-Präparat ²⁾	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	mg
ATP-Na ₂	1	—	1	—	1	—	1	mg
AcP-Li ₂ ²⁾	—	1	—	1	—	1	—	mg
Acetylcholin, gef.	119	170	4	19	3	97	9	γ /ccm

Durch stufenweise Ammonsulfat-Fällung der neutralisierten Fraktion B gelingt eine Auftrennung: Fraktion B₁ (0–16g/Vol.-% Ammonsulfat), Fraktion B₂ (16–30g/Vol.-% Ammonsulfat) und Fraktion B₃ (30–50g/Vol.-% Ammonsulfat).

Die Fraktion B₁ enthält wenig Cholinacetylase neben einem Hemmstoff unbekannter Art und wird verworfen; die *Fraktion B₂* enthält die Hauptmenge Cholinacetylase; die *Fraktion B₃* enthält die Hauptmenge Phosphotransacetylase (Tabb. 4 und 5).

Tabelle 4. Ammonsulfat-Fällungen der Fraktion B

Die mit 0.1 *N* KOH auf p_H 6.8 eingestellten 4ccm Inkubationslösung enthielten außer den angegebenen Zusätzen im ccm: 1 mg Cystein·HCl, 1 mg Cholinchlorid, 0.2 mg MgCl₂·6H₂O, 0.5 mg Titriplex III (E. MERCK), 9.8 mg Kaliumacetat, 0.25 mg Eserinsalicylat. — Inkubiert wurde 12 Stdn. bei 28°. — Fraktionierung wie im Versuchsteil angegeben.

Zusatz/ccm Inkubationslösung									
Fraktion B (8.1 mg Protein/ccm)	0.25	0.25	—	—	—	—	—	—	ccm
Dialysierte Fraktion B (2 mg Protein/ccm)	—	—	0.25	0.25	—	—	—	—	ccm
Dialysierte Fraktion B ₁ (0.7 mg Protein/ccm)	—	—	—	—	0.125	—	—	0.125	ccm
Dialysierte Fraktion B ₂ (1.2 mg Protein/ccm)	—	—	—	—	—	0.125	—	0.125	ccm
Fraktion B ₃ (4.6 mg Protein/ccm)	—	—	—	—	—	—	0.125	0.125	ccm
CoASH-Präparat	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	mg
ATP-Na ₂	1	—	1	—	—	—	—	—	mg
AcP-Li ₂	—	1	—	1	1	1	1	1	mg
Acetylcholin, gef.	20	220	6	140	10	30	6	274	γ /ccm

Tabelle 5. Ammonsulfat-Fällungen der Fraktion B mit Acetat-aktivierendem Bakterienenzym
Versuchsbedingungen wie in Tabelle 4

	Zusatz/ccm Inkubationslösung							
Fraktion B (8.1 mg Protein/ccm)	—	0.25	—	—	—	—	—	ccm
Dialysierte Fraktion B (2 mg Protein/ccm)	—	—	0.25	—	—	—	—	ccm
Dialysierte Fraktion B ₁ (0.7 mg Protein/ccm)	—	—	—	0.125	—	—	—	ccm
Dialysierte Fraktion B ₂ (1.2 mg Protein/ccm)	—	—	—	—	0.125	—	0.125	ccm
Fraktion B ₃ (4.6 mg Protein/ccm)	—	—	—	—	—	0.125	0.125	ccm
Acetat-aktivierendes Bakterienenzym	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	ccm
CoASH-Präparat	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	mg
ATP-Na ₂	1	1	1	1	1	1	1	mg
Acetylcholin, gef.	1	169	261	36	402	7	317	γ/ccm

Durch nochmalige, stufenweise Fällung der Fraktion B₂ gelangen wir bei 16–29 g/Vol.-% Ammonsulfat zur *umgefällten Fraktion B₂* mit angereicherter Cholinacetylase (Tab. 6). Die Ammonsulfat-Konzentration dieser Fällung entspricht den Fällungskonzentrationen (15–35 g/Vol.-%) der Cholinacetylasen aus Meerschweinchen-^{10,9)} und Kaninchenhirn¹⁰⁾ sowie aus Tintenfisch-Kopfganglien¹¹⁾.

Tabelle 6. Cholinacetylase in umgefällter Fraktion B₂
Versuchsbedingungen wie in Tabelle 4

	Zusatz/ccm Inkubationslösung					
Dialysierte, umgefällte Fraktion B ₂ (0.7 mg Protein/ccm)	0.125	—	—	0.125	0.125	ccm
Fraktion B ₃	—	0.125	—	0.125	—	ccm
Acetat-aktivierendes Bakterienenzym	—	—	0.125	—	0.125	ccm
CoASH-Präparat	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	mg
ATP-Na ₂	—	—	1	—	1	mg
AcP-Li ₂	1	1	—	1	—	mg
Acetylcholin, gef.	35	38	3	268	400	γ/ccm

Durch nochmalige, stufenweise Ammonsulfat-Fällung der Fraktion B₃ gelangen wir bei 35–50 g/Vol.-% Ammonsulfat zur *umgefällten Fraktion B₃* mit angereicherter *Phosphotransacetylase* (Tab. 7). Die Ammonsulfat-Konzentration dieser Fällung bei *p_H* 6.8 kann verglichen werden mit der Fällungskonzentration (31–37 g/Vol.-% bei *p_H* 8) der *Phosphotransacetylase* aus dem anaeroben Bakterium *Clostridium Kluyveri*¹²⁾ und mit der Fällungskonzentration (25–50 g/Vol.-% bei *p_H* 6.8) der Acetylcholin-synthetisierenden *Transacetylase* aus *Streptobacterium plantarum* 10 S³⁾.

10) W. E. BALFOUR und C. HEBB, J. Physiology **118**, 94 (1952).

11) R. BERMAN, I. B. WILSON und D. NACHMANSOHN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **12**, 315 (1953).

12) E. R. STADTMAN, G. D. NOVELLI und F. LIPMANN, J. biol. Chemistry **191**, 365 (1951); E. R. STADTMAN, ebenda **196**, 527, 535 (1952).

Tabelle 7. Phosphotransacetylase in umgefällter Fraktion B₃
Versuchsbedingungen wie in Tabelle 4

	Zusatz/ccm Inkubationslösung					
Fraktion B ₃ (3.1 mg Protein/ccm)	0.125	—	—	0.125	—	ccm
Umgefällte Fraktion B ₃ (2.6 mg Protein/ccm)	—	0.125	—	—	0.125	ccm
Dialysierte, umgefällte Fraktion B ₂	—	—	0.125	0.125	0.125	ccm
CoASH-Präparat	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	mg
AcP-Li ₂	1	1	1	1	1	mg
Acetylcholin, gef.	8	3	8	222	220	γ/ccm

CHOLINACETYLASE

An Cholinacetylase in Form der umgefällten, dialysierten Fraktion B₂ wird etwa 1/500 des Fliegen-Trockengewichtes erhalten: 10 g Fliegen → 2.7 g acetongetrocknetes Fliegenpulver → 200 mg Protein im Extrakt → 105 mg Protein in Fraktion B → 22 mg Protein in Fraktion B₂ → 5.6 mg Protein in umgefällter, dialysierter Fraktion B₂. — Das Verhältnis Hirnvolumen:Körpervolumen wird bei Insekten zwischen 1:174 und 1:4200 angegeben⁴⁾.

Stabilität, Einflüsse von Temperatur und p_H

Die Cholinacetylase in der umgefällten, dialysierten Fraktion B₂ ist wie andere Cholinacetylase¹⁾ gegenüber Wärme recht empfindlich. Während nach einmonatigem Aufbewahren bei p_H 6.8 im eingefrorenen Zustand (bei -10°) noch 84% der ursprünglichen Acetylcholinbildung gefunden werden und bei $+4^\circ$ noch die Hälfte, besitzt eine Probe nach 1 stdg. Aufbewahrung bei $+28^\circ$ nurmehr etwa ein Drittel der ursprünglichen Aktivität (Tab. 16). Jedoch findet sich bei 12 stdg. Inkubation *kein* ausgeprägtes *Temperaturoptimum* der Acetylcholinsynthese zwischen 17 und 32° (Tab. 15).

Unterhalb p_H 5.8 und oberhalb p_H 9.2 wird die Cholinacetylase rasch inaktiviert, ohne daß sich dazwischen ein ausgeprägtes Stabilitätsoptimum zeigen würde (Tab. 16); deshalb darf die Essigsäurefällung des Extraktes bei p_H 4.5 nicht lange stehen. Für die Acetylcholinsynthese findet sich bei 12 stdg. Inkubation *kein* ausgeprägtes p_H -Optimum zwischen p_H 6.2 und 7.5 (Tab. 19).

Spezifische Aktivität, Einflüsse von CoA und Zubringerfermenten

Von eingesetztem CoA-Ac wird der Acetyl-Rest durch die Cholinacetylase praktisch vollständig auf Cholin übertragen (Tab. 8); noch sehr geringe Mengen Cholinacetylase lassen sich deshalb ermitteln (vgl. Tab. 11). Mit S-Acetyl-glutathion an Stelle von CoA-Ac wird kein Acetylcholin gebildet. Ferner spaltet die Cholinacetylase nicht Acetylphosphat.

Tabelle 8. Coenzym A-acetat und Cholinacetylase

Versuchsbedingungen mit 2 ccm Inkubationslösung wie in Tabelle 4.
Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurde abgebrochen wie bei Tabelle 2.

Inkubationszeit	15	30	60	120	0	120	Min.
Zusatz/ccm Inkubationslösung							
Dialysierte, umgefällte Fraktion B ₂ (0.53 mg Protein/ccm)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	ccm
CoA-Ac-Lösung (chemisch) (220 γ CoA-Ac/0.1 ccm ¹³⁾)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	ccm
Acetylcholin, gef.	11	19	37	46	0.4	0.3	γ /ccm
Acetylcholin/g Protein $\times$ Stdn.	663	572	565	348	—	2	mg

Die nach 120 Min. erhaltene Synthese von 46 γ /ccm Acetylcholin entspricht einem 95-proz. Umsatz des verwandten CoA-Ac. Somit könnte nach Tabelle 8 CoA-Ac in Mengen ab etwa 3 γ /ccm in gefärbten oder trüben Lösungen ermittelt werden.

Da die synthetisierte Menge Acetylcholin der Menge CoA-Ac entspricht, hängt beim Einsatz von CoA mit Zubringerfermenten und Energielieferanten an Stelle von vorgebildetem CoA-Ac die Acetylcholinsynthese von diesen drei Faktoren ab und kann zu deren Bestimmung dienen. Von diesen zahlreichen Möglichkeiten hat uns zunächst der Einfluß der Menge und der Qualität von CoA auf die Acetylcholinsynthese beschäftigt, wobei Fliegen-Phosphotransacetylase oder Acetat-aktivierendes Bakterienenzym als Zubringerfermente dienten.

Da der Gehalt der dialysierten, umgefällten Fraktion B₂ an CoA sehr gering ist, verglichen mit der Acetylcholin-synthetisierenden Transacetylase aus dem Milchsäurebakterium¹⁴⁾, lassen sich nunmehr bereits *Mengen ab 0.05 γ CoA/ccm Inkubationslösung ermitteln* (Tab. 9).

Tabelle 9. Hochprozentriges Coenzym A und Cholinacetylase mit Phosphotransacetylase
Versuchsbedingungen wie Tab. 4; außer den über der Tab. 4 angegebenen Zusätzen enthielten die Inkubationslösungen noch im ccm: 0.125 ccm umgefällte Fraktion B₃ und 1 mg AcP-Li₂.

Zusatz/ccm Inkubationslösung									
Dialysierte, umgefällte Fraktion B ₂ (0.94 mg Protein/ccm)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	ccm
CoA, 75-proz. ¹⁵⁾	—	0.05	0.1	0.4	1.6	6.4	25.6	102.4	(116 γ Protein) γ
Acetylcholin, gef.	1	2	3	9	30	105	239	398	γ /ccm
Acetylcholin/g Protein $\times$ Stdn.	0.7	1.2	2.4	6.5	21	75	170	282	mg

Eine Hemmung der Acetylcholinsynthese durch überoptimale Mengen von niedrigprozentigen, 1- bis 20-proz. CoASH-Präparaten²⁾, wie sie mit der Acetylcholin-

¹³⁾ Bestimmt mit der Nitroprussid-Reaktion nach F. LYNEN, Liebigs Ann. Chem. **574**, 33 (1951); die dortige Fig. 2 diente als Standardkurve.

¹⁴⁾ Acetylcholin III: Liebigs Ann. Chem. **601**, 233 (1956).

¹⁵⁾ Herrn Prof. K. ZEILE im Hause C. H. BOEHRINGER SOHN, Ingelheim, danken wir verbindlichst für die sehr entgegenkommende Überlassung dieses Präparates.

synthetisierenden Transacetylase sich einstellt¹⁴⁾, tritt in dem System Fliegen-Cholinacetylase + Fliegen-Phosphotransacetylase *nicht* ein (Tabb. 10 und 11). Bei Verdacht auf unbekannte Hemmstoffe ist somit dieses System zur *Bestimmung von CoA* zu bevorzugen.

Tabelle 10. Niedrigprozentiges Coenzym A und Cholinacetylase mit Phosphotransacetylase. Versuchsbedingungen wie in Tabelle 9

	Zusatz/ccm Inkubationslösung										ccm (49.4 γ Protein)
Dialysierte, umgefällte Fraktion B ₂ (0.79 mg Protein/ccm)	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	γ
CoASH-Präparat	0	16	31	63	125	250	500	1000	2000	8000	
Acetylcholin, gef.	0.5	24	76	129	198	207	266	333	397	421	γ /ccm
Acetylcholin/g Protein $\times$ Stdn.	1	39	128	216	334	350	449	563	670	711	mg

Tabelle 11. Überoptimale Mengen niedrigprozentiges Coenzym A und Cholinacetylase mit Phosphotransacetylase. Versuchsbedingungen wie in Tabelle 9

	Zusatz/ccm Inkubationslösung										ccm (5.4 γ Protein)
Dialysierte, umgefällte Fraktion B ₂ (0.7 mg Protein/ccm)	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	γ
CoASH-Präparat	0	16	31	63	125	250	500	1000	2000	4000	8000
Acetylcholin, gef.	1	5	6	8	10	15	21	24	23	24	22
Acetylcholin/g Protein $\times$ Stdn.	13	72	87	117	151	223	314	358	354	364	333

Jedoch stellt sich die Hemmung der Acetylcholinsynthese durch überoptimale Mengen CoASH-Präparat mit Acetat-aktivierendem Bakterienenzym wieder ein (Tab. 17). Es kann der unbekannte Hemmstoff im CoASH-Präparat nur am Bakterienenzym angreifen, wobei offen bleibt, ob es sich um denselben Stoff handelt, der auch die Acetylcholin-synthetisierende Transacetylase¹⁴⁾ hemmt oder nicht.

Die spezifischen Aktivitäten der angereicherten, aber sicher noch nicht reinen Cholinacetylase in den dialysierten, umgefällten Fraktionen B₂ haben nach *zwölfstündiger* Inkubation bis zu 711 mg Acetylcholin/g Protein $\times$ Stdn. betragen (Tab. 10). In derselben Größenordnung liegen die Angaben für die spezifischen Aktivitäten der aus Meerschweinchenhirn von H. KUMAGAI und S. EBASHI⁹⁾ angereicherten Cholinacetylase und der angereicherten Acetylcholin-synthetisierenden Transacetylase aus dem Milchsäurebakterium³⁾, während sich für die aus Tintenfisch-Kopfganglien von R. BERMAN, I. B. WILSON und D. NACHMANSON¹⁶⁾ besonders sorgfältig angereicherte Cholinacetylase eine, um eine Größenordnung höhere, spezifische Aktivität von 10536 mg Acetylcholin/g Protein $\times$ Stdn. errechnet. Jedoch lassen sich diese Zahlen-

¹⁶⁾ Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **12**, 315 (1953).

werte für die spezifischen Aktivitäten nicht direkt vergleichen, sofern Angaben über die Dauer der Inkubation fehlen, da die Werte für die spezifischen Aktivitäten der Cholinacetylase bereits nach 1 Stunde erheblich und nach etwa 4 Stunden stark abfallen¹⁾ (Tab. 12).

Tabelle 12. Dauer der Inkubation und spezifische Aktivitäten

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 9.

Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurde abgebrochen wie bei Tabelle 2.

Inkubationszeit	0	1/4	1/2	1	2	4	18	Stdn.
Zusatz/ccm Inkubationslösung								
Dialysierte, umgefällte Fraktion B ₂ (0.7 mg Protein/ccm)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	ccm
CoASH-Präparat	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	mg
Acetylcholin, gef.	2	12	24	37	60	125	191	γ/ccm
Acetylcholin/g Protein × Stdn.	—	548	540	423	345	356	121	mg

Einflüsse von Cystein und Ionen auf die Acetylcholinbildung

Die Bestandteile der von D. NACHMANSON¹⁾ angegebenen und auch in unseren Versuchen sehr bewährten Inkubationslösung beeinflussen die gebildete Menge Acetylcholin recht mannigfaltig (Tab. 18).

Das zu 1⁰⁰ enthaltene Cystein wirkt zwiespältig, sowohl fördernd als auch vermindernd. *Fördernd* kann Cystein dadurch wirken, daß bei der aeroben Inkubation die Oxydation von CoA und anderen SH-Verbindungen zu Disulfiden verringert wird und eingesetzte Disulfide zu Mercaptanen reduziert werden (Tab. 24). *Vermindernd* kann Cystein nach R. STADTMAN¹²⁾ dadurch wirken, daß die energiereichen Acetyl-Reste aus CoA-Ac (Tabb. 18 und 24) und aus AcP (Tab. 21) übernommen und an Wasser statt an Cholin weitergegeben werden; diese Wirkung wird durch viel Kaliumacetat kompensiert (Tabb. 18 und 24). Ob es sich bei dieser Hydrolyse durch Cystein in unseren Fällen um eine rein nichtenzymatische Übertragung von energiereichen Acetyl-Resten handelt oder nicht, haben wir ebensowenig verfolgt wie die Bildung von Acetylcholin bei der Kombination von CoA mit S-Acetyl-mercaptan-Verbindungen, Cholin und Cholinacetylase.

Eines Zusatzes von Mg²⁺ bedarf die Cholinacetylase in der dialysierten, umgefällten Fraktion B₂ *nicht* (Tab. 18); auch nicht eines Zusatzes von *Eserin*, der jedoch routinemäßig beibehalten worden ist.

Hemmstoffe

Durch Hemmstoffe der Acetylcholin-synthetisierenden Transacetylase³⁾ läßt sich die Cholinacetylase aus Fliegen im kompetitiven Hemmversuch nicht beeinflussen. Darin gleicht sie der Cholinacetylase aus Meerschweinchenhirn¹⁷⁾. So hemmt z.B.

¹⁷⁾ H. KUMAGAI, S. EBASHI und F. TAKEDA, *Folia pharmacol. japon.* **49**, 477 (1953); S. EBASHI, *ebenda* **49**, 485 (1953) [*C. A.* **48**, 13754 (1954)].

Tabelle 14. Phosphotransacetylase mit Acetylphosphat und Coenzym A, Arsenat sowie Fluorid
Die mit 0.1 *M* KOH auf pH 6.7 eingestellten 4 ccm Inkubationslösungen enthielten außer den angegebenen Zusätzen im ccm:
1 mg Cystein · HCl, 0.2 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.5 mg Tiriplex III, 9.8 mg Kaliumacetat. — Inkubiert wurde bei 28°. — Es wurden
jeweils 0.5 ccm Inkubationslösung zur kolorimetrischen Analyse entnommen²³⁾.

	Zusatz ccm Inkubationslösung											
	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
Umgefällte Fraktion B ₃												ccm
CoA, 75-proz. ¹⁵⁾		0.1										mg
AcP-Li ₂	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	mg
KH ₂ AsO ₄												mg
KF												mg
AcP-Li ₂ , gef. nach Sidn.	2	800	583	600	665	607						γ ccm
	4	720	343	378	447	403						γ ccm
	8		120	113	212	164						γ ccm
	21						707	371	557	643	657	664
	51						629	160	371	515	521	543
	22						240	0	0	93	114	107
												93

besonders ausgeprägte Spezifität der Cholinacetylase aus. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhange noch die erstaunliche *Wirkungslosigkeit von Arsenit und von Arsenat* bei der Cholinacetylase, auch nach einer Vormischzeit (Tab. 13). Diese mangelnde Beeinflußbarkeit bei kompetitiven Hemmversuchen ermöglicht in dem System Cholinacetylase — Zubringerferment für CoA-Ac ein bequemes Studium der Hemmbarkeiten aller Zubringerenzyme, z. B. von Acetat-aktivierenden Enzymen und Phosphotransacetylasen, an Hand der Acetylcholinbildung.

FLIEGEN-PHOSPHOTRANSACETYLASE

Die Phosphotransacetylase in der umgefällten Fraktion B₃ verträgt 14 stdg. Aufbewahren bei 28° zwischen pH 6.3 und 8.8 ohne Inaktivierung (Tab. 20). Mit dieser Stabilität gleicht sie der Acetylcholin-synthetisierenden Transacetylase aus dem Milchsäurebakterium³¹⁾ und den Acetylphosphatasen aus Säugetieren²²⁾.

Um die Eigenschaften dieser bemerkenswerten Phosphotransacetylase näher kennen zu lernen, haben wir ihren Einfluß auf die Hydrolyse von AcP bei Gegenwart von CoA sowie Arsenat untersucht (Tab. 14).

Wie Tabelle 14 zeigt, wird die fermentative AcP-Spaltung weder durch CoA noch durch CoA + Arsenat erhöht. Durch diese *fehlende Arsenolyse* unterscheidet sich die Fliegen-Phosphotransacetylase eindeutig von der Bakterien-Phosphotransacetylase aus *Cl. Kluyveri*¹²⁾ und von der Acetylcholin-synthetisierenden Transacetylase aus dem Milchsäurebakterium³¹⁾. Vielmehr zeigt die Fliegen-

²²⁾ F. LIPMANN, J. biol. Chemistry **160**, 173 (1945); Science [Washington] **120**, 855 (1954).

²³⁾ Hydroxamsäure-Reaktion nach F. LIPMANN und L. C. TUTTLE, J. biol. Chemistry **159**, 21 (1945).

Phosphotransacetylase mit dieser nicht CoA-bedürftigen Spaltung von AcP eine typische *Acetylphosphatase-Wirkung*²²⁾.

Ebenso wie Acetylphosphatase aus Säugetiergeweben durch Phosphat und Fluorid hemmbar ist²⁴⁾, wird die AcP-Spaltung durch die Fliegen-Phosphotransacetylase außer durch Arsenat (Tab. 14) und Phosphat (Tab. 21) auch durch Fluorid gehemmt (Tab. 14).

Die andere Wirkung der Fliegen-Phosphotransacetylase, die Übertragung des Acetyl-Restes von AcP auf CoA, läßt sich in dem System mit Cholinacetylase an der Acetylcholinsynthese deutlich verfolgen (Tabb. 9–12). Kompetitiv gehemmt wird diese Reaktion durch 2-Methyl-1.4-naphthochinon-8-sulfonsäure > Morin > Chlortetracyclin (Tab. 22). *Arsenit hemmt* die Entstehung von CoA-Ac auffällig stark (Tab. 23). *Arsenat hemmt nicht* unter Versuchsbedingungen, welche eine Reduktion zu Arsenit ausschließen; jedoch tritt eine starke Hemmung auf, wenn durch Zusatz von Cystein oder Verwendung von CoASH-Präparat größere Mengen an reduzierenden SH-Gruppen verfügbar werden (Tab. 23).

Einflüsse von Na⁺ und K⁺: Deutlich gehemmt wird die Acetylcholinbildung in dem System Fliegen-Phosphotransacetylase mit Cholinacetylase durch Na⁺ an Stelle von K⁺ (Tab. 24). Deshalb ist in allen späteren Versuchen als Kation in Pufferlösungen K⁺ bevorzugt worden.

Schließlich haben wir noch geprüft, ob in der umgefällten Fraktion B₃ etwa Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase²⁵⁾ vorhanden sei. Jedoch hat ein Zusatz von Acetaldehyd und DPN an Stelle von AcP in der Inkubationslösung kein Acetylcholin ergeben. Dieses negative Ergebnis deckt sich mit dem negativen bei der Arsenolyse.

ACETAT-AKTIVIERENDES BAKTERIENENZYM

Durch die Unempfindlichkeit der Fliegen-Cholinacetylase im kompetitiven Hemmstoffversuch läßt sich in dem System Cholinacetylase mit Acetat-aktivierendem Bakterienenzym³⁾ folgende Hemmstoffreihe für das letztgenannte Bakterienenzym ermitteln: Morin >> 2-Methyl-1.4-naphthochinon-8-sulfonsäure > Chlortetracyclin (Tab. 22).

Nach G. J. MARTIN und Mitarbeitern²⁶⁾ wird in einem Extrakt aus acetonetrocknetem Rattenhirn die Acetylcholinbildung u. a. auch durch Morin gehemmt, was von den Autoren einer gehemmten Cholinacetylase zugeschrieben worden ist. Im Zusammenhang mit anderen Hemmversuchen in Präparaten aus Säugetierhirn¹⁷⁾ und unseren eigenen Versuchen taucht jetzt der Verdacht auf, daß diese Hemmung durch

²⁴⁾ B. SHAPIRO und E. WERTHEIMER, *Nature* [London] **156**, 690 (1945).

²⁵⁾ J. HARTING und S. F. VELICK, *J. biol. Chemistry* **207**, 867 (1954); S. F. VELICK, ebenda **203**, 563 (1953).

²⁶⁾ J. M. BEILER, R. BRENDLE, M. GRAFF und G. J. MARTIN, *Arch. Biochemistry* **26**, 72 (1950).

Morin eher dem Acetat-aktivierenden Enzym als Zubringerferment für CoA-Ac zuzuschreiben ist.

In ähnlicher Weise erklärt sich die von G. T. GIRVIN und J. W. STEVENSON²⁷⁾ in einem Extrakt aus Milchsäurebakterien festgestellte *Fluorid*-Hemmung der Acetylcholinbildung als eine Hemmung des Acetat-aktivierenden Bakterienenzym³⁾.

Dessen Hemmbarkeit durch Arsenat haben wir selbst früher übergangen³⁾. Im Extrakt aus acetontrockneten Milchsäurebakterien hat sich mit ATP als Energiequelle bei Zusatz von Arsenat stets weniger Acetylcholin ergeben als mit AcP; eine sichere Erklärung für diese „zusätzliche“ Arsenolyse fehlte bisher. Diese läßt sich jetzt geben durch die Feststellung, daß *Arsenat* das Acetat-aktivierende Bakterienenzym sehr viel stärker hemmt als *Arsenit* (Tab. 25). Beim Acetat-aktivierenden Enzym aus Taubenleber ist umgekehrt eine Hemmung durch Arsenit, aber nicht durch Arsenat beschrieben worden²⁸⁾.

DIE BEDEUTUNG DER CHOLINACETYLASE UND DER PHOSPHOTRANSACETYLASE IN DER STUBENFLIEGE

Nachdem wir den Extrakt aus acetontrocknetem Pulver von *ganzen* Fliegen hergestellt haben, läßt sich über die ursprüngliche Lokalisation der Cholinacetylase und der Phosphotransacetylase in den Fliegen nichts aussagen. Jedoch ist es sehr wahrscheinlich, daß die Cholinacetylase dem Nervengewebe der Fliegen entstammt, da auch sonst Cholinacetylase bisher nur vergesellschaftet mit Acetylcholinesterase und Acetylcholin in Nervengeweben von Wirbeltieren und Fischen angetroffen worden ist¹⁾. Die Auffassung, daß dem Abbau und Aufbau von Acetylcholin auch im Nervensystem von Insekten⁴⁾ eine bedeutsame Rolle bei der Reizleitung zukommt¹⁾, wird durch die Cholinacetylase aus der Stubenfliege weiter gestützt. Bei der Vergiftung mit spezifisch Cholinesterase-hemmenden Insektiziden dürfte somit in Fliegen und anderen Insekten, ebenso wie in Säugetieren, Acetylcholin in Teilen des Nervengewebes nach dem Schema 1, S. 34, aufgestaut werden.

Mit dem Vorkommen einer Phosphotransacetylase in der Stubenfliege ist diese Fermentart *erstmalig* auch *außerhalb* des Einzellerreiches in einem höheren Lebewesen nachgewiesen. Aller Wahrscheinlichkeit nach fehlt AcP als natürliches Substrat nicht in der Stubenfliege, auch wenn es dort bisher nicht entdeckt worden ist bei der Bilanz der Phosphor-Verbindungen²⁹⁾.

Hinsichtlich der Lokalisation der Phosphotransacetylase in der Stubenfliege stellen wir nach Schema 2, S. 47, folgende Überlegung an: Im Milchsäurebakterium findet sich die bei der Ammonsulfat-Fraktionierung untrennbare Kombination von Phosphotransacetylase mit Cholinacetylase-Aktivität; in der Stubenfliege trennen

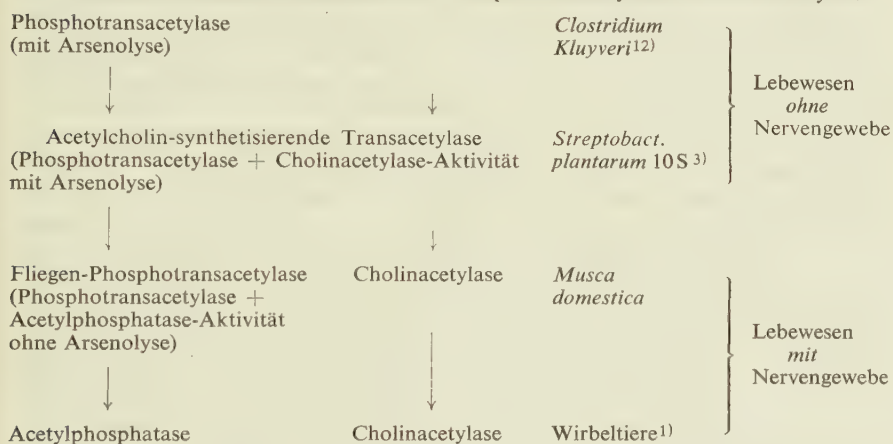
²⁷⁾ Canad. J. Biochem. Physiol. **32**, 131 (1954) [C. A. **48**, 5910 (1954)].

²⁸⁾ G. R. SEAMAN, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1712 (1954).

²⁹⁾ F. P. W. WINTERINGHAM, P. M. BRIDGES und G. C. HELLYER, Biochem. J. **59**, 13 (1955).

sich bei der Ammonsulfat-Fraktionierung in benachbarten Fraktionen die Cholinacetylase von einer Phosphotransacetylase mit Acetylphosphatase-Aktivität; in Säugetieren findet sich Acetylphosphatase nicht nur in Leber und Muskeln²²⁾, sondern auch in der weißen und grauen Hirnsubstanz verteilt³⁰⁾. Deshalb glauben wir annehmen zu dürfen, daß die angereicherte Fliegen-Phosphotransacetylase, wenn auch nicht ausschließlich wie die Cholinacetylase, so doch teilweise dem Nervengewebe der Stubenfliege entstammt. Darin wäre dann die gesamte Fermentgarntur nach Schema 1, S. 34, enthalten und die rasche, ausdauernde Reaktionsfähigkeit der Stubenfliege wäre u. a. von der doppelten, ausgiebigen Nachlieferungsmöglichkeit für CoA-Ac her verständlich.

Schema 2. Bekannte Vorkommen von Phosphotransacetylase und Cholinacetylase



Sicher werden künftig Phosphotransacetylasen noch in weiteren Insekten und anderen niederen Tierarten mit und ohne differenziertem Nervensystem aufgefunden werden. Entwicklungsgeschichtlich wird es reizvoll sein zu verfolgen, welche weiteren Übergangsfermente zwischen Bakterien-Phosphotransacetylase und Säugetier-Acetylphosphatase existieren (Schema 2).

Die Cholinacetylasen aus den Nervengeweben höherer und niederer Tiere scheinen einander sehr ähnlich zu sein. Übergangsfermente zwischen der Acetylcholin-synthetisierenden Transacetylase und der Cholinacetylase sind deshalb nur zu erwarten bei niederen Lebewesen ohne differenzierte Nerven, welche Acetylcholin enthalten, also etwa bei Protozoen³¹⁾ oder Trypanosomen³²⁾.

³⁰⁾ W. ASHBY, R. F. GARZOLI und E. M. SCHUSTER, Amer. J. Physiology **170**, 116 (1952) [Ber. ges. Physiol. exp. Pharmacol. **160**, 299 (1953)].

³¹⁾ G. R. SEAMAN in S. H. HUTNER und A. LWOFF, *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, Bd. 2, S. 92, Academic Press Inc., New York 1955.

³²⁾ M. GUGGENHEIM, *Die biogenen Amine*, 4. Aufl., S. Karger, Basel 1951, S. 158.

Frau H. NIISCHE, geb. BLANK, danken wir herzlich für die eifrige und geschickte Ausführung der Fliegenzucht und der Acetylcholinbestimmungen. — Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT haben wir für die gewährte Sachbeihilfe zu danken.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Der Proteingehalt wurde mit Hilfe der Biuret-Reaktion bestimmt^{33,34}. Die Acetylcholinmengen wurden im Blutegeltest nach FÜHNER²⁹ ermittelt; die angegebenen Werte beziehen sich auf Acetylcholinchlorid. Die pH -Werte wurden, soweit nichts anderes vermerkt ist, mit den Spezialindikatorpapieren von E. MERCK gemessen.

Fliegenbrei und Zentrifugat, acetontrocknetes Fliegenpulver und Extrakt

Stubenfliegen. — Es wurden 3 Tage alte Stubenfliegen einer bei 28° gehaltenen Zucht verwandt, die seit 1953 als Inzucht gehegt wird. Vor dem Versuch wurden die Zuchtgefäße $\frac{1}{2}$ Stde. lang in das Gefrierfach eines Haushaltskühlschranks gelegt⁵¹. Die so erhaltenen, *kältestarren Fliegen* begannen bei Raumtemperatur nach etwa 1 Min. sich wieder zu bewegen. 100 derartige, *kältestarre Fliegen* wogen etwa 1 g.

Fliegenbrei und Zentrifugat. — 2,2 g *kältestarre Fliegen* wurden mit 10 ccm *Extraktionslösung*³⁴⁾ in einer Porzellanreibschale verrieben zu 11 ccm *Fliegenbrei*.

2,2 g *kältestarre Fliegen* wurden mit 20 ccm *Extraktionslösung* in einer Porzellanreibschale verrieben; dieser Ansatz blieb 2 Stdn. lang bei 4° im Kühlschrank und wurde gelegentlich umgerührt. Durch halbstündiges Zentrifugieren in einer RUSSE-Zentrifuge (15000 U./Min.) erhielt man über dem Sediment 20 ccm eines trüben, rotgefärbten *Zentrifugates*.

Acetontrocknetes Fliegenpulver. In den vorgekühlten Glasbecher eines Homogenisators (STARMIX) gab man 50 ccm auf 4° abgekühlte *Extraktionslösung* und schüttete in den auf vollen Touren laufenden Homogenisator so rasch als möglich 10 g *kältestarre Fliegen*. 30 Sekunden nach Beginn des Einschüttens wurde abgestellt und der entstandene *Fliegenbrei* sofort in 600 ccm bereitstehendes, auf 4° abgekühltes Aceton eingerührt. Dieses Gemisch blieb sodann 10 Min. im Kühlschrank bei 4° und wurde anschließend in vorgekühlten Metallbechern bei 3000 U./Min. in einer STOCK-Zentrifuge 10 Min. lang zentrifugiert. Der Niederschlag ließ sich mit einem Spatel zerkleinern und mit wenig kaltem Aceton zu einem gleichmäßigen Brei anteigen. Diesen Brei verdünnte man unter Rühren mit 400 ccm Aceton von 4° und ließ die Suspension $\frac{1}{2}$ Stde. bei 4° im Kühlschrank stehen. Anschließend wurde $\frac{1}{2}$ Stde. lang bei 3000 U./Min. zentrifugiert. Der sofort nach dem Zentrifugenstillstand durch vorsichtiges Dekantieren erhaltene, acetonfeuchte Rückstand wurde in einer geräumigen, rauhwandigen Porzellanreibschale verrieben, bis kein Aceton mehr zu riechen war. Es wurden so durchschnittlich 2,7 g *acetontrocknetes Fliegenpulver* aus 10 g *Fliegen* erhalten; bei 4° im Exsikkator über Silicagel aufbewahrt, behielt das lockere, graurote Pulver über 1 Jahr seine volle Acetylcholin-bildende Fähigkeit³⁵⁾.

³³⁾ A. G. GORNALL, C. J. BARDWILL und M. M. DAVID, J. biol. Chemistry **177**, 751 (1949).

³⁴⁾ Zur Herstellung wurden 3,72 g KCl und 1,74 g K_2HPO_4 (E. MERCK, Nr. 5101) in 900 ccm dest. Wasser gelöst; diese Lösung brachte man mit n HCl auf pH 6,7–6,8 und ergänzte zu 1000 ccm mit dest. Wasser.

³⁵⁾ Proben von acetontrocknetem Fliegenpulver stellen wir Interessenten gerne zur Verfügung.

Auf die beschriebene Weise konnten bis zu 50 g Fliegen auf einmal verarbeitet werden. — Bei kleineren Ansätzen, 1–10 g Fliegen, wurde ohne Einbuße an Ausbeute und Aktivität in der Porzellanreibschale zerkleinert.

Extrakt. — 2 g acetongetrocknetes Fliegenpulver wurden mit 2.7 g Aluminiumpulver (RIEDEL DE HAËN, feines Pulver) in einer vorgekühlten Porzellanreibschale von etwa 15 cm Durchmesser fest und gleichmäßig verrieben. Dieses Gemisch wurde in einer vorgekühlten Porzellanreibschale mit 20 ccm Extraktionslösung³⁴⁾ von 4° vermengt, wobei durch anfängliche, tropfenweise Zugabe ein gleichmäßiger Teig hergestellt wurde. Die schließlich entstandene Suspension blieb 2 Stdn. lang bei 4°, wobei etwa alle Viertelstunde noch 1 bis 2 Minuten lang kräftig verrieben wurde; dann zentrifugierte man in vorher auf –5° gekühlten Metallbechern $\frac{1}{2}$ Stde. bei 15000 U/Min. Die vom Niederschlag abgegossene Restlösung wurde durch einen Glaswollebausch filtriert. Sie lieferte 14.5 ccm leicht getrübbten *Extrakt* von orangeroter Farbe, der durchschnittlich 14 mg Protein/ccm enthielt. Der *Extrakt* büßte durch viertägiges Aufbewahren bei 4° die Hälfte seiner Aktivität ein.

Wurde der beim Zentrifugieren erhaltene Niederschlag nochmals in 20 ccm Extraktionslösung suspendiert, dann fielen nach dem Zentrifugieren 20 ccm eines zweiten *Extraktes* mit 3 mg Protein/ccm an, welcher ebenfalls noch aktiv war. Ein dritter *Extrakt* war nicht mehr aktiv.

Durch 1–3tägige Dialyse im Cellophanschlauch gegen Extraktionslösung bei 4° im Kühlschrank wurde ein *dialysierter Extrakt* erhalten, der durchschnittlich 8.3 mg Protein/ccm enthielt.

Fraktionierung des Extraktes und Umfällung der Fraktionen

14.5 ccm eines eisgekühlten *Extraktes* wurden im Eisbad unter Umschwenken durch Zusatz von etwa 10 Tropfen 10-proz. Essigsäure auf p_H 4.5 gebracht und weiter 2 Stdn. lang bei 0° belassen. Hierauf wurde in vorgekühlten Gehängebechern 15 Min. bei 15000 U/Min. zentrifugiert. Der von der *überstehenden Lösung* abgetrennte Niederschlag machte etwa die Hälfte des im *Extrakt* ursprünglich gelösten Proteins aus. Der Niederschlag löste sich nur sehr unvollkommen in 7 ccm Extraktionslösung auf; diese Suspension, *Fraktion A*, ergab nach zweitägiger Dialyse bei 4° gegen Extraktionslösung eine *dialysierte Fraktion A*, die 4.5 mg Protein/ccm enthielt.

Die *überstehende Lösung* wurde im Eisbad unter Umschwenken durch tropfenweisen Zusatz von n KOH auf p_H 6.8 gebracht; diese *Fraktion B*, 15 ccm, enthielt durchschnittlich 7 mg Protein/ccm und ergab nach zweitägiger Dialyse bei 4° gegen Extraktionslösung eine *dialysierte Fraktion B*, die durchschnittlich 2.3 mg Protein/ccm enthielt.

In 15 ccm vorgekühlter *Fraktion B* gab man unter kräftigem Umschwenken im Eisbad 2.4 g feinstgepulvertes Ammonsulfat, 0–16 g/Vol.-%, beließ noch 15 Min. im Eisbad und zentrifugierte dann 15 Min. bei 15000 U/Min. Der von der überstehenden Lösung abgetrennte Niederschlag ergab, in 7.5 ccm Extraktionslösung aufgenommen, eine *Fraktion B₁*, die, bei 4° gegen Extraktionslösung dialysiert, eine *dialysierte Fraktion B₁* lieferte.

Die zentrifugierte, überstehende Lösung wurde im Eisbad mit 2.1 g Ammonsulfat, 16 bis 30 g/Vol.-%, wie oben beschrieben, gefällt und weiter verarbeitet zu *Fraktion B₂* und zu *dialysierter Fraktion B₂*.

Die zentrifugierte, überstehende Lösung von der letztgenannten Fällung lieferte bei weiterer Fällung mit 3 g Ammonsulfat, 30–50 g/Vol.-%, und Aufarbeitung eine *Fraktion B₃*,

welche nach fünftägiger Dialyse bei 4 gegen Extraktionslösung eine *dialysierte Fraktion B₃* mit deutlich verminderter Aktivität ergab.

Umgefällte Fraktionen B₂ und B₃. Die Mischung von 7.5 ccm *Fraktion B₂* und 7.5 ccm Extraktionslösung wurde im Eisbad mit 2.4 g Ammonsulfat wie oben beschrieben gefällt. Die abzentrifugierte Trübung wurde verworfen und die überstehende Restlösung weitergefällt mit 1.95 g Ammonsulfat, 16–29 g Vol.-%. Der abzentrifugierte Niederschlag löste sich in 7.5 ccm Extraktionslösung und lieferte nach Dialyse bei 4 gegen Extraktionslösung 8 ccm *umgefällte, dialysierte Fraktion B₂* mit durchschnittlich 0.7 mg Protein/ccm.

Die Mischung von 7.5 ccm *Fraktion B₃* und 7.5 ccm Extraktionslösung wurde im Eisbad wie oben mit 5.25 g Ammonsulfat gefällt. Die abzentrifugierte Fällung enthielt die Hauptmenge der beigemengten Cholinacetylase.

Die überstehende Lösung lieferte bei weiterer Fällung mit 1.25 g Ammonsulfat, 35 bis 50 g/Vol.-%, einen Niederschlag, der, gelöst in 7.5 ccm Extraktionslösung, eine *umgefällte Fraktion B₃* mit durchschnittlich 2.1 mg Protein/ccm ergab.

Acetat-aktivierendes Bakterienenzym. – 30 ccm Extrakt²⁷ aus acetongetrockneten Bakterien, *Streptobacterium plantarum* 10S²¹, wurden, wie früher beschrieben³¹, mit 20-proz. Essigsäure auf p_{H} 4.5 gebracht und über Nacht bei 0° belassen. Die abzentrifugierte Fällung löste sich in 30 ccm Extraktionslösung; diese Lösung wurde im Eisbad durch Zugabe von 10-proz. Essigsäure auf p_{H} 4.7 gebracht. Nach 2stdg. Stehenlassen bei 0° zentrifugierte man, nahm den Niederschlag in 30 ccm Extraktionslösung auf und fällte zunächst mit 9 g Ammonsulfat eine Fraktion, die nach dem Zentrifugieren verworfen wurde. Aus der überstehenden Lösung fällte man durch Zugabe von weiteren 9 g Ammonsulfat, 30–60 g Vol.-%, eine Fraktion, die, in 10 ccm Extraktionslösung aufgenommen und gegen dest. Wasser 2 Tage lang bei 4° dialysiert, *Acetat-aktivierendes Bakterienenzym* mit durchschnittlich 0.3 mg Protein/ccm ergab.

Zubereitungen von Coenzym A-Acetat

*CoA-Ac-Lösung (chemisch)*³⁶⁾. 15 mg 75-proz. CoA¹⁵⁾ (0.015 mMol CoASH vom Mol.-Gew. 767) wurden bei 0° in 2.55 ccm (0.015 mMol) einer frisch bereiteten Mischung von 0.015 ccm Essigsäureanhydrid in 25.5 ccm Wasser gelöst. Unter Umschwenken gab man im Eisbad dazu nacheinander einige Körnchen KHCO_3 bis p_{H} 7.5, beließ weitere 10 Min. im Eisbad und gab dann tropfenweise eine etwa 10-proz. Suspension von Dowex 50 (Säureform) im Verlauf von etwa 10 Min. zu, bis der konstante p_{H} -Wert 6.0 erreicht war. Nach dem Filtrieren ergänzte man auf 3 ccm CoA-Ac-Lösung (chemisch).

Bei der *Gehaltsbestimmung* mit der Hydroxamsäure-Reaktion²³⁾ wurden in 0.1 ccm dieser CoA-Ac-Lösung 240% CoA-Ac (Mol.-Gew. 810) ermittelt, was einer Acetylierung von 60% d. Th. entsprach. Bei der Gehaltsbestimmung mit der Nitroprussid-Reaktion¹³⁾ wurden in 0.1 ccm dieser CoA-Ac-Lösung 307% CoA-Ac ermittelt, was einer Acetylierung von 77% d. Th. entsprach. Nach 5tägiger Aufbewahrung bei 4° fanden sich nurmehr 220% CoA-Ac/0.1 ccm (Tab. 8).

Als 0.1 ccm dieser CoA-Ac-Lösung ccm Inkubationslösung mit Cholinacetylase nach Tab. 8, S. 40, zur Acetylcholinsynthese verwandt wurden, ließen sich nach 4stdg. Inkubation mit dem Blutegetest 65% Acetylcholin ccm Inkubationslösung nachweisen. Unter der Annahme, daß sich aus 1 Mol. CoA-Ac nur 1 Mol. Acetylcholin bilden konnte, ergab sich ein

³⁶⁾ E. J. SIMON und D. SHEMA, J. Amer. chem. Soc. **75**, 2520 (1953).

Gehalt von 308 γ CoA-Ac/0.1 ccm CoA-Ac-Lösung, was einer Acetylierung von ebenfalls 77 % d. Th. entsprach.

Mit diesem Ergebnis war gleichzeitig nachgewiesen, daß CoA-Ac mit Cholinacetylase vollständig zu Acetylcholin umgesetzt wurde.

Der niedrigere Wert aus der Hydroxamsäure-Reaktion, welche nicht weiter untersucht wurde, erinnert an die erniedrigten Werte aus der Hydroxamsäure-Reaktion nach S. HESTRIN³⁷⁾ bei der Bestimmung von Acetylcholin³⁾.

CoA-Ac-Lösung, biologisch I (mit Acetat-aktivierendem Bakterienenzym). – Es wurde eine *Salzlösung* bereitet, welche in 10 ccm enthielt: 125 mg Cystein·HCl, 25 mg MgCl·6H₂O, 62.5 mg Titriplex III (E. MERCK), 1225 mg Kaliumacetat, 30 mg Eserinsalicylat. Davon vermischte man 2.2 ccm mit einer Lösung von 5.5 mg 75-proz. CoA¹⁵⁾ und 100 mg ATP-Na₂ in 4.4 ccm Wasser sowie mit 5.5 ccm *Acetat-aktivierendem Bakterienenzym* und stellte die Mischung mit *n* KOH auf p_H 6.7 ein. Die so erhaltenen 12.75 ccm wurden 3 Stdn. bei 28° geschüttelt. Die Synthese wurde hierauf unterbrochen durch Zugabe von 2*n* HCl bis p_H 4.5, anschließendes Erhitzen im Wasserbad mit aufgesetztem Rückflußkühler während 10 Min. und Abkühlen im fließenden Wasser. Nach dem Einstellen auf p_H 6.7 mit *n* KOH ergaben sich 14.52 ccm CoA-Ac-Lösung, biologisch I.

Zur *Gehaltsbestimmung* wurden 1.32 ccm dieser Lösung mit 0.25 ccm *dialysierter, umgefällter Fraktion B₂* sowie mit 2.5 mg Cholinchlorid in 0.1 ccm gemischt und mit Wasser auf 2.5 ccm ergänzt. Nach 4 stdg. Inkubation bei 28° konnten 20 γ /ccm Acetylcholin mit dem Blutegeltest nachgewiesen werden, was, unter der Annahme eines vollständigen Umsatzes von CoA-Ac zu Acetylcholin, einer Acetylierung von 54 % d. Th. entsprach.

CoA-Ac-Lösung, biologisch II (mit Phosphotransacetylase der umgefällten Fraktion B₃). – 5.6 ccm obenstehender *Salzlösung* vermischte man mit einer Lösung von 140 mg 10-proz. CoASH-Präparat in 22.4 ccm Wasser und mit einer Lösung von 70 mg AcP-Li₂ in 5.6 ccm Wasser sowie mit 14 ccm *umgefällter Fraktion B₃* und stellte die Mischung mit *n* KOH auf p_H 6.8 ein. Die erhaltenen 48.6 ccm wurden 4 Stdn. bei 28° geschüttelt. Nach der Aufarbeitung (wie oben) erhielt man 54 ccm CoA-Ac-Lösung, biologisch II.

Zur *Gehaltsbestimmung* wurde wie oben beschrieben verfahren mit einem Inkubationsansatz von 5 ccm, welcher 3.8 ccm CoA-Ac-Lösung, biologisch II, und 0.5 ccm dialysierte, umgefällte *Fraktion B₂* sowie 5 mg Cholinchlorid enthielt. Die mit dem Blutegeltest ermittelten 21 γ Acetylcholin/ccm Inkubationslösung entsprachen einer Acetylierung von 45% der Theorie.

Cholinacetylase

Tabelle 15. Temperaturabhängigkeit der Acetylcholinsynthese

Die mit 0.1 *n* KOH auf p_H 6.8 eingestellten 2 ccm Inkubationslösung enthielten außer den über Tab. 3 angegebenen Zusätzen noch im ccm: 0.125 ccm dialysierte, umgefällte *Fraktion B₂* und 0.1 ccm CoA-Ac-Lösung (chemisch). Inkubiert wurde je 12 Stdn. bei der angegebenen Temperatur.

Temperatur	0°	17°	28°	32°	37°	45°	
Acetylcholin, gef.	13	29	26	27	9	0.3	γ /ccm

Tabelle 16. p_H -Einfluß auf die Stabilität der Cholinacetylase

Je 1 ccm dialysierte, umgefällte *Fraktion B₂* wurde mit 0.1 *n* bzw. *n* HCl oder KOH auf die angegebenen p_H -Werte eingestellt und mit Wasser auf 1.2 ccm ergänzt, woraufhin die Ansätze 15 Stdn. bei 28° blieben. – Je 0.6 ccm dieser *vorbehandelten Fraktion B₂* wurden wie in Tab. 4 zu 4 ccm Inkubationslösung verwandt, die außerdem noch im ccm enthielt: 0.125 ccm umgefällte *Fraktion B₃*, 0.5 mg CoA·SH-Präparat und 1 mg AcP-Li₂. – Inkubiert wurde 1 Stde. bei 28°; abgebrochen wurde wie in Tab. 2.

p_H der Vorbehandlung	2	2.8	4.5	5.8	6.8	8.7	9.2	10.7	6.8	15 Stdn. bei 4°
Acetylcholin, gef.	0.2	0.2	0.2	12	13	14	12	1	36	γ /ccm

³⁷⁾ J. biol. Chemistry **180**, 249 (1949).

Tabelle 17. Überoptimale Mengen niedrigprozentiges Coenzym A und Cholinacetylase mit Acetat-aktivierendem Bakterienenzym

Versuchsbedingungen wie in Tabelle 4. — Außer den über der Tab. 4 angegebenen Zusätzen enthielten die Inkubationslösungen noch im cem: 0.125 cem Acetataktivierendes Bakterienenzym und 1 mg ATP-Na₂.

	Zusatz/ccm Inkubationslösung											
	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
Dialysierte, umgefällte Fraktion B ₂ (0.79 mg Protein, cem)												ccm
CoA-SH-Präparat	0	15	63	125	250	500	1000	2000	4000	8000	γ	
Acetylcholin, gef.	12	106	118	109	153	169	158	105	106	79	γ/cem	

Unter den Bedingungen der Tabelle 17 wurde eine ungehemmte Acetylcholinsynthese mit 75-proz. CoA¹⁵⁾ bis zur Konzentration von 100 γ/ccm Inkubationslösung beobachtet.

Tabelle 18. Einflüsse von Bestandteilen der Inkubationslösung bei Cholinacetylase mit Coenzym A-acetat

Die mit 0.1 n KOH auf pH 6.7 eingestellten 2 cem Inkubationslösung enthielten außer den in der Tabelle angegebenen Zusätzen im cem: 1 mg Cholinchlorid und 0.25 mg Eserinsalicylat. — Inkubiert wurde 12 Stdn. bei 28°.

	Zusatz/ccm Inkubationslösung											
	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
Dialysierte, umgefällte Fraktion B ₂	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	ccm
CoA-Ac-Lösung (chemisch)	—	1	—	1	1	1	—	1	1	1	1	ccm
Cystein-HCl	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	—	—	—	0.2	—	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	mg
Titriplex III	—	—	—	0.5	—	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	mg
Kaliumacetat	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	mg
Acetylcholin, gef.	12	18	16	36	20	16	32	26	0.1	3	33	γ/cem

Tabelle 19. p_H -Abhängigkeit der Acetylcholinsynthese

Je 5ccm Inkubationslösung waren mit 0.1 *n* bzw. *n* HCl oder KOH auf die angegebenen p_H -Werte eingestellt. Die Inkubationslösungen enthielten außer den über der Tab. 4 angegebenen Zusätzen noch im ccm: 0.125ccm dialysierte, umgefällte Fraktion B₂ und 0.76ccm CoA-Ac-Lösung, biologisch II. — Inkubiert wurde 12 Stdn. bei 28°.

p_H	4.1	4.9	6.0	6.2	6.4	6.5	6.8	7.0	7.5	8.1	8.4	9.2	10
Acetylcholin, gef.	1	4	15	22	22	20	21	23	21	18	18	0.6	0.2

γ/ccm

Phosphotransacetylase

Tabelle 20. p_H -Einfluß auf die Stabilität der Phosphotransacetylase

Je 1ccm umgefällte Fraktion B₃ wurde mit je 0.5ccm der angegebenen Pufferlösung gemischt. Diese Mischungen wurden auf die angegebenen p_H -Werte mit 0.1 *n* KOH oder HCl nachgestellt und mit Wasser auf 2ccm ergänzt; die Ansätze blieben 14 Stdn. bei 28° bzw. 4°. Je 1ccm dieser vorbehandelten Fraktionen B₃ wurde wie in Tabelle 4 zu 4ccm Inkubationslösung verwandt, die außerdem noch im ccm enthielt: 0.125ccm dialysierte, umgefällte Fraktion B₂, 0.5mg CoA-SH-Präparat und 1mg AcP-Li₂. — Inkubiert wurde 3 Stdn. bei 28° und abgebrochen wie in Tabelle 2.

Temperatur der Vorbehandlung	4°	4°	28°	28°	28°	28°	28°	28°	28°	28°
p_H der Vorbehandlung mit 0.01 <i>m</i> Kaliumphosphat-Puffer	6.9	—	8.8	8	6.9	6.3	4.9	4	3	—
p_H der Vorbehandlung mit Natrium-diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer ³⁾	—	7.6	—	—	—	—	—	—	—	7.6
Acetylcholin, gef.	γ/ccm	82	87	88	86	81	83	18	6	6

81

Tabelle 21. Phosphotransacetylase mit Acetylphosphat und Phosphat sowie Cystein

Die mit 0.1 *n* KOH auf p_H 6.7 eingestellten 4ccm Inkubationslösung enthielten außer den angegebenen Zusätzen im ccm: 0.2mg MgCl₂·6H₂O, 0.5mg Titriplex III und 9.8mg Kaliumacetat. — Die Inkubationslösungen enthielten von vornherein 0.22mg K₂HPO₄/ccm. — Im übrigen wie Tabelle 14.

Zusatz/ccm Inkubationslösung									
Umgefällte Fraktion B ₃	0.125	0.125	—	—	0.125	0.125	ccm		
AcP-Li ₂	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	mg		
Cystein-HCl	1	1	—	1	—	1	mg		
K ₂ HPO ₄	—	1	—	—	—	—	mg		
AcP-Li ₂ , gef. nach Stdn.	2	421	478					γ/ccm	
	5	171	210					γ/ccm	
	1			915	854	712	771	γ/ccm	
	2			864	800	550	583	γ/ccm	
	4			797	720	312	343	γ/ccm	
	24			571	300	0	0	γ/ccm	

Tabelle 22. Hemmversuche bei Phosphotransacetylase und Acetat-aktivierendem Bakterienenzym

Versuchsbedingungen wie Tabelle 4. — Außer den über der Tab. 4 angegebenen Bestandteilen enthielten alle Inkubationslösungen 0.125ccm dialysierte, umgefällte Fraktion B₂.

Zusatz/ccm Inkubationslösung									
Umgefällte Fraktion B ₃	0.125	0.125	0.125	0.125	—	—	—	—	ccm
Acetat-aktivierendes Bakterienenzym	—	—	—	—	0.125	0.125	0.125	0.125	ccm
AcP-Li ₂	1	1	1	1	—	—	—	—	mg
ATP-Na ₂	—	—	—	—	1	1	1	1	mg
CoA, 75-proz. ¹⁵⁾	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05	0.05	0.05	0.05	mg
Morin	—	1	—	—	—	1	—	—	mg
2-Methyl-1.4-naphthochinon-8-sulfonsaures Kalium ¹⁸⁾	—	—	1	—	—	—	1	—	mg
Chlortetracyclin	—	—	—	1	—	—	—	1	mg
Acetylcholin, gef.	162	97	43	140	163	4	46	100	γ/ccm

Tabelle 23. Arsenat- und Arsenit-Hemmung der Phosphotransacetylase

Die mit 0.1 *n* KOH auf *p*_H 6.8 eingestellten 4 ccm Inkubationslösung enthielten außer den angegebenen Zusätzen im ccm: 1 mg Cholinchlorid, 0.2 mg MgCl₂ · 6 H₂O, 0.5 mg Titriplex III, 9.8 mg Kaliumacetat, 0.25 mg Eserinsalicylat, 0.125 ccm dialysierte, umgefällte Fraktion B₂ und 0.125 ccm umgefällte Fraktion B₃. — Inkubiert wurde 12 Stdn. bei 28°.

	Zusatz/ccm Inkubationslösung																
CoA, 75-proz. ¹⁵⁾	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—	0.1	0.1	0.1	—	—	—	mg
CoA · SH-Präparat	—	—	—	—	—	1	1	1	1	1	—	—	—	1	1	1	mg
AcP-Li ₂	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	mg
Cystein · HCl	—	1	—	1	2	—	1	—	1	2	—	1	2	—	1	2	mg
KH ₂ AsO ₄	—	—	1	1	1	—	—	1	1	1	—	—	—	—	—	—	mg
NaAsO ₂	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	1	1	1	1	mg
Acetylcholin, gef.	169	190	180	63	59	56	183	36	69	68	12	13	13	17	19	20	γ/ccm

Tabelle 24. Einflüsse von Cystein, Acetat, K⁺ und Na⁺ bei Cholinacetylase mit Phosphotransacetylase

Die mit 0.1 *n* KOH auf *p*_H 6.7 eingestellten 4 ccm Inkubationslösung enthielten außer den angegebenen Zusätzen im ccm: 1 mg Cholinchlorid, 0.2 mg MgCl₂ · 6 H₂O, 0.2 mg Eserinsalicylat, 0.5 mg Titriplex III, 1 mg AcP-Li₂, 0.125 ccm dialysierte, umgefällte Fraktion B₂ und 0.125 ccm umgefällte Fraktion B₃. — Inkubiert wurde 12 Stdn. bei 28°.

	Zusatz/ccm Inkubationslösung												
CoA, 75-proz. ¹⁵⁾	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	—	—	—	—	—	mg
CoA · SH-Präparat	—	—	—	—	—	—	0.5	0.5	—	0.5	0.5	—	mg
Cystein · HCl	—	0.5	2	—	0.5	2	—	1	—	1	1	—	mg
Natriumacetat · 3 H ₂ O	—	—	—	—	—	—	—	—	—	13.6	—	—	mg
Kaliumacetat	—	—	—	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	—	—	9.8	—	mg
Acetylcholin, gef.	139	2	1	142	143	202	56	183	—	28	66	—	γ/ccm

Tabelle 25. Arsenat- und Arsenit-Hemmung des Acetat-aktivierenden Bakterienenzym
Versuchsbedingungen wie in Tabelle 24

	Zusatz/ccm Inkubationslösung								
Acetat-aktivierendes Bakterienenzym	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	ccm
CoA, 75-proz. ¹⁵⁾	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	mg
ATP-Na ₂	1	1	1	1	1	1	1	1	mg
Cystein · HCl	—	1	—	1	2	—	—	2	mg
KH ₂ AsO ₄	—	—	1	1	1	—	—	—	mg
NaAsO ₂	—	—	—	—	—	1	1	1	mg
Acetylcholin, gef.	230	392	15	69	73	89	98	—	γ/ccm

Lebenslauf

Am 11. Januar 1927 wurde ich, Adolf Friedrich Gunter Roth, als zweiter Sohn des Prokuristen Albrecht Roth und seiner Ehefrau Margarete, geb. Wenzel, in Nürnberg geboren. Nach 4-jähriger Volksschulzeit von 1933—1937 trat ich in das Reform-Realgymnasium am Lauferschlagturn in Nürnberg ein und wurde dort nach 2 Jahren in die Oberschule übernommen. Durch die Kriegseignisse war ab 1943, also ab der 6. Klasse, kein geregelter Unterricht mehr möglich, der schließlich am 8. September 1944 in der 7. Klasse abgebrochen wurde. Erst nach Kriegsende, am 10. Oktober 1945, kam ich in den Besitz eines Abgangszeugnisses der Oberschule für Jungen am Lauferschlagturn in Nürnberg.

Am 15. Februar 1943 wurde ich als Luftwaffenhelfer nach Stein bei Nürnberg eingezogen und nach 1 Jahr und 7 Monaten im September 1944 zur Ableistung meiner Arbeitsdienstpflicht entlassen. Für die Ablegung von Segelflugprüfungen konnte ich nach 2 Monaten aus dem Arbeitsdienst ausscheiden und kam schließlich als Offiziersbewerber am 3. April 1945 zur Flugzeugführerschule A 52 nach Goslar. Nach kurzem Erdeinsatz im Harz geriet ich mit einer kleinen Verletzung am 17. April 1945 in einem Lazarett in Quedlinburg in amerikanische und später in englische Gefangenschaft, aus der ich am 14. Aug. 1945 entlassen wurde.

Zum Winter-Semester 1945/1946 bekam ich die Zulassung zum Studium der Chemie an der Universität Erlangen. Nach 4 Semestern entschloß ich mich, als Fachrichtung Lebensmittelchemie zu wählen und konnte schließlich im Dezember 1950 meine Vorprüfung mit der Gesamtnote „sehr gut“ ablegen. Nach weiteren 4 Semestern bestand ich am 24. Oktober 1952 die praktische und theoretische Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker mit dem Gesamturteil „gut“. Seit November 1952 arbeite ich bei Herrn Prof. Dr. O. Dann an einer Doktorarbeit und bin dort seit dem 1. August 1953 zuerst als wissenschaftliche Hilfskraft und ab 1. November 1953 als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle tätig. Ab Winter-Semester 1954/1955 wurde ich als Vorlesungsassistent für Pharmazeutische Chemie bei Herrn Prof. Dr. O. Dann eingesetzt und außerdem zur Abhaltung eines speziellen Praktikums mit herangezogen.

